

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 191–195

Kinetische immunologisch-turbidimetrische C3-Bestimmung mit einem Fast Analyzer

Von H. Ebeling

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce) am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 21. Juli 1977)

Zusammenfassung: Es wird eine neue immunologisch-turbidimetrische Methode zur quantitativen Einzel-Protein-Bestimmung vorgestellt. Sie beruht im Prinzip auf einer Initial-Rate-Analyse mit Fixed-Time-Kinetik. Für das Protein-Beispiel C3 werden optimale Bedingungen beschrieben für das Puffermilieu, die Reaktionszeitdauer, die „Initial-Rate“-Intervallzeit, die Antigen- und Antikörper-Konzentration. Mit diesen optimierten, standardisierten Bedingungen ist man in der Lage, bei einem Reaktionszeitintervall von $\Delta A/15$ Sekunden bereits nach 20 Sekunden Meßergebnisse von 29 Proben zu erhalten. Bei guter relativer Richtigkeit und einem Variationskoeffizienten von Tag zu Tag von 4,3 bzw. 6,4% für C3-Konzentrationen von 217,5 bzw. 435 mg/l empfiehlt sich diese Technik für das klinisch-chemische Laboratorium. An anderer Stelle wird ausführlich über Methodenvergleiche und Messungen von Patientensera berichtet werden.

Kinetic immunological-turbidimetric determination of C-3 protein with a Fast Analyzer

Summary: A new immunological-turbidimetric method is described for the quantitative determination of individual proteins. It is based on initial rate analysis with fixed time kinetics. The optimal conditions for the analysis of C-3 protein are described, with respect to buffer composition, reaction time, the time interval for measurement of the initial rate, and the concentrations of antigen and antibody. With these optimised, standardised conditions, it is possible to obtain results for 29 samples in 20 seconds, using a reaction time of $\Delta A/15$ seconds. The method is relatively accurate with a day to day variation coefficient of 4.3 for C-3 concentrations of 217.5 mg/l, and 6.4 for concentrations of 435 mg/l. It is therefore suitable for the clinical chemical laboratory. A detailed comparison of this with other methods, and its use in the measurement of patients' sera will be presented elsewhere.

Einleitung und Fragestellung

Zunehmend setzen sich in der Klinischen Chemie mechanisierte Analysensysteme zum quantitativen, immunologischen Bestimmen von Antigenen und Antikörpern durch. Meist beruhen diese Systeme auf dem Äquilibrium-Meßprinzip (1–3). In Anlehnung an Buffone et al. (4), (5) wird in der vorliegenden Arbeit versucht, mit dem auf dem Andersonschen Prinzip (6) beruhenden Zentrifugen-Analysator, CENTRIFICHEM SYSTEM 400, quantitativ, immunoturbidimetrisch Antigene und Antikörper zu bestimmen. Ähnlich wie bei neueren Substrat-Bestimmungs-Methoden sollte hier das Meßprinzip von „Initial-Rate“- bzw. „Short-Fixed-Time“-Analysen zur C3-Bestimmung herangezogen werden.

Material und Methoden

Geräte

Zentrifugen-Fast-Analyzer CENTRIFICHEM SYSTEM 400, Fa. UNION CARBIDE/LA ROCHE, Basel.

Reagenzien

Britton-Robinson-Puffer-NaCl-Lösung (plus 35 mg/l Netzmittel Triton X-100), pH 6,00, 11 mmol/l (2).
Standard-Human-Serum Batch No. 1001 C,
Protein-Standard-Serum B Batch No. 475 D,
Human-Plasmaprotein-Antiserum vom Kaninchen Anti- $\beta_1 C/\beta_1 A$ -Globulin Serum Batch No. 5106 A,
Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg.

Vorgehen

Materialgewinnung

Sofort nach venöser Blutentnahme Abfüllen von 2 ml Blut in Spezialgefäße aus Glas, die üblicherweise zum Bestimmen von

Fibrinogen-Spaltprodukten dienen (an anderer Stelle wird dieses Vorgehen begründet werden). Sample Collection Tubes aus THROMBO-WELLCOTEST, Fa. WELLCOME REAGENTS LIMITED, Beckenham, England, enthalten pro Glasröhrchen folgende Zusätze:

etwa 3600 NF Units Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor und 20 NIH Units Thrombin vom Rind.

Anschließend sofortiges gründliches Durchmischen und Ausginnenlassen der Blutprobe bei 37°C im Brutschrank für etwa 30 Minuten. Dann Zentrifugieren und Abhebern des Serum-Überstandes und Lagern des Probenmaterials bei -20°C im Gefrierschrank bis zum Bestimmen.

Proben- und Antiserum-Vorbereitung

Proben-Vorverdünnung z. B. 1:2 und Antiserum-Vorverdünnung z. B. 1:10 mit der Puffer-Lösung (s. o.). Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Konzentration der vorverdünnten Probe auf dem aufsteigenden Schenkel der „Heidelberger-Kurve“ zur Antigen-Bestimmung liegen muß (2).

Kalibrierung

Erstellen der Standardkurve aus Standard-Human-Serum-Vorverdünnungen im C3-Konzentrationsbereich von 0 bis etwa 600 mg/l in 50 bis 100 mg/l-Schritten.

Volumina-Einstellungen am Pipettor

sample	(= vorverdünnte Probe)	5 µl
sample + diluent	(= vorverdünnte Probe plus Puffer-Lösung)	95 µl
reagent	(= vorverdünntes Antiserum)	250 µl

Analyser-Einstellungen

temperature	25°C
filter	292 nm
T ₀ time delay	005 sec.
ΔT time interval	00:15 min.
abnormal absorbance	4,9 U
blank	AUTO
test mode	RATE
print out	CONC.
concentration factor	1000
no. of prints	1
test code	00

Berechnung

1. Graphische Darstellung der Standardkurve:

Ordinate: Trübungsänderung/Zeitintervall $\triangle(\Delta A)/\Delta t$, z. B. $\Delta A/15$ s.

Abzisse: Konzentration in mg/l.

2. Ermittlung der Probenkonzentration:

Auf der Standardkurve wird für das gemessene $\Delta A/15$ s der unbekannten, vorverdünnten Probenkonzentration die dazugehörige Konzentration auf der Abzisse aufgesucht und zur Berechnung der Ausgangskonzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Ergebnisse und Diskussion

Beim Erarbeiten dieser Methode haben wir uns eng an die von uns ermittelten optimierten Bedingungen zur mechanisierten immunologisch-nephelometrischen Antigen- und Antikörper-Bestimmung über den TECHNICON AUTO-ANALYZER II gehalten (2). Dabei hat sich wiederum die Britton-Robinson-Puffer-NaCl-Lösung, pH 6,00,

11 mmol/l, gut bewährt im Gegensatz zu anderen Verdünnungsmitteln wie physiologische NaCl-Lösung mit und ohne Polyethylenglykol-Zusatz (2-5, 1).

Wie die Abbildung 1 zeigt, sind Reaktionsgeschwindigkeiten zum Zeitpunkt t_0 nur für relativ niedrigere C3-Konzentrationen unter diesen Bedingungen meßbar. Mit zunehmender Antigen-Konzentration verschieben sich die Kurvenscheitelpunkte weiter nach links, so daß die Anfangsgeschwindigkeiten hier höher liegen und unsere „Short-Fixed-Time“-Meßwerte bereits auf den absteigenden Schenkeln der Reaktionszeit-Kurven liegen. Da jedoch die kürzest mögliche Reaktionszeit, gerätebedingt, 15 Sekunden beträgt, konnten nur für C3-Konzentrationen kleiner als 100 mg/l „Initial-Rate“-Kinetiken gemessen werden. Für C3-Konzentrationen größer als 100 mg/l konnten folglich „Short-Fixed-Time“-Kinetiken nicht als echte „Initial-Rate“-Analysen durchgeführt werden.

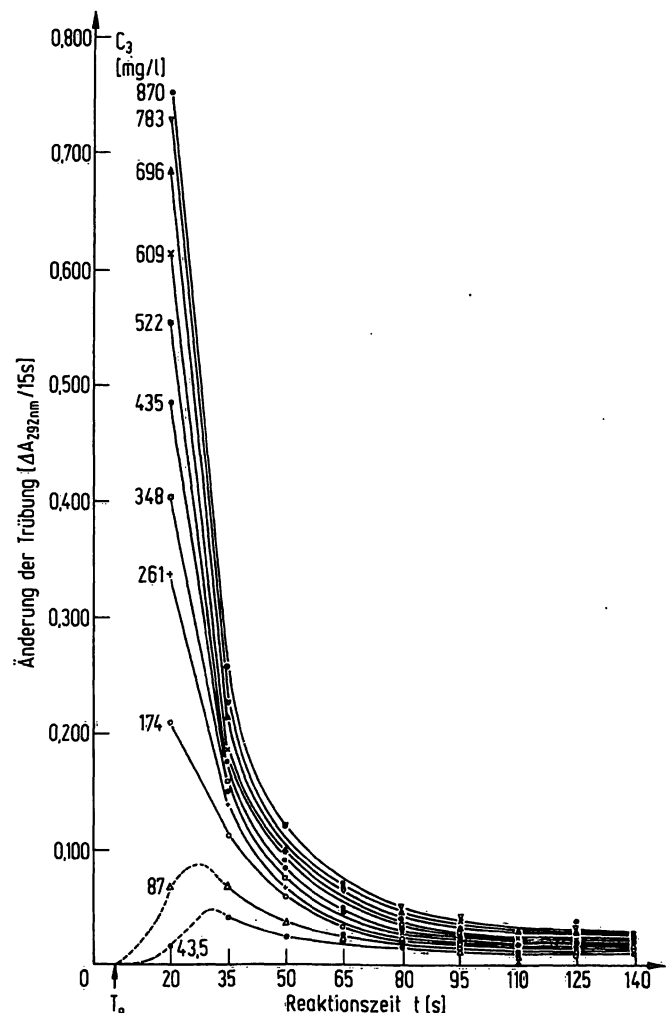


Abb. 1. Kinetische Trübungsänderung pro 15-Sekunden-Zeitintervall bei unterschiedlichen C3-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit: Antiserum-Vorverdünnungen (1:10) und Standard-Human-Serum-Vorverdünnungen mit Britton-Robinson-Puffer-NaCl-Lösung plus Netzmittelzusatz, pH 6,00, 11 mmol/l Gesamtsalzkonzentration.

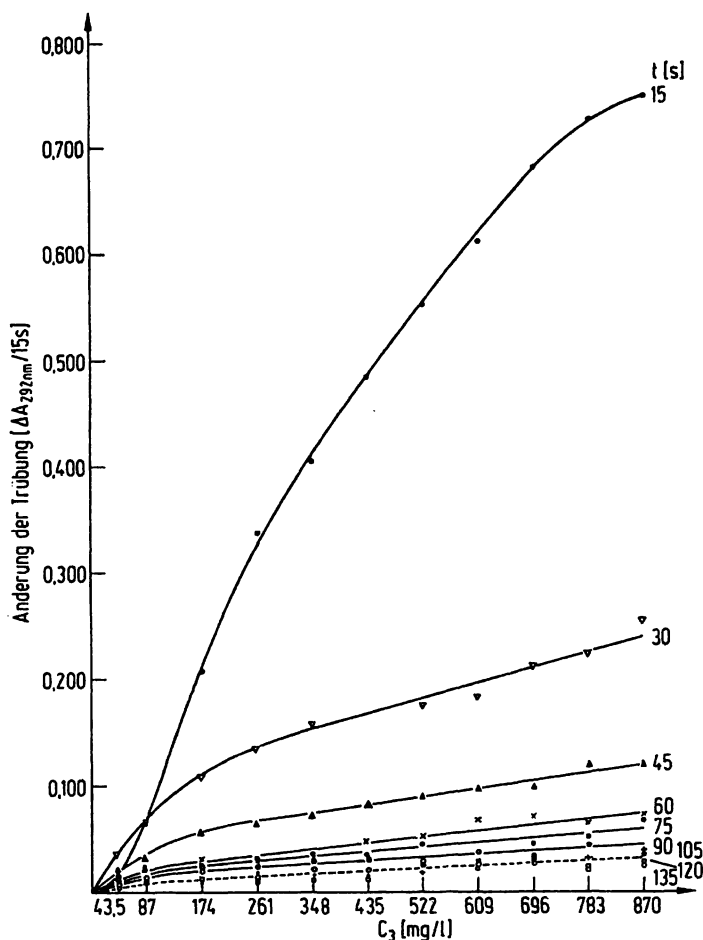


Abb. 2. Kinetische Trübungsänderung pro 15-Sekunden-Zeitintervall nach unterschiedlich langen Reaktionszeiten in Abhängigkeit von der C₃-Konzentration: Reaktionsbedingungen wie bei Abb. 1.

Wie die Abbildung 2 zeigt, lassen sich im Allgemeinen deutliche Unterschiede in der Trübungsänderung pro Zeitintervall ($\Delta A/\Delta t$) bei unterschiedlichen C₃-Konzentrationen nur durch das Aufzeichnen von Anfangs-Kinetiken feststellen. So sind z. B. Reaktionszeiten von mehr als 60 Sekunden bei diesem System nicht mehr zu quantitativen Bestimmungen zu gebrauchen. Mit zunehmender Reaktionszeit nimmt nämlich die Trübungsänderung pro Zeitintervall rapide ab (s. auch Abb. 1 und 2).

Aus den Abbildungen 3 und 4 ist ersichtlich, daß kinetische immuno-turbidimetrische C₃-Bestimmungen ebenfalls den Gesetzen der „Antikörper-Bestimmungskurven“ (2) und „Heidelberger-Kurven“ gehorchen. Abbildung 3 zeigt die Trübungsänderungen nach 15 Sekunden Reaktionszeit in Abhängigkeit von den jeweiligen Antigen-Antikörper-Konzentrationen. Entsprechend werden niedrigere Antigen-Konzentrationen mit höheren Antiserum-Vorverdünnungen und höhere Antigen-Konzentrationen mit niedrigeren Antiserum-Vorverdünnungen optimal bestimmt. Kleinere Antiserum-Vorverdünnungen als 1:10 führten hier bei höheren Antigen-Konzentrationen (ab etwa 170 mg/l) aufgrund starker Präzipitat-Bildung und meßtechnisch bedingter, unerwünschter Sedimentation der Reaktionsprodukte durch das Zentrifugierprinzip zu falschen Meßergebnissen. Abbildung 4 dokumentiert, daß sich

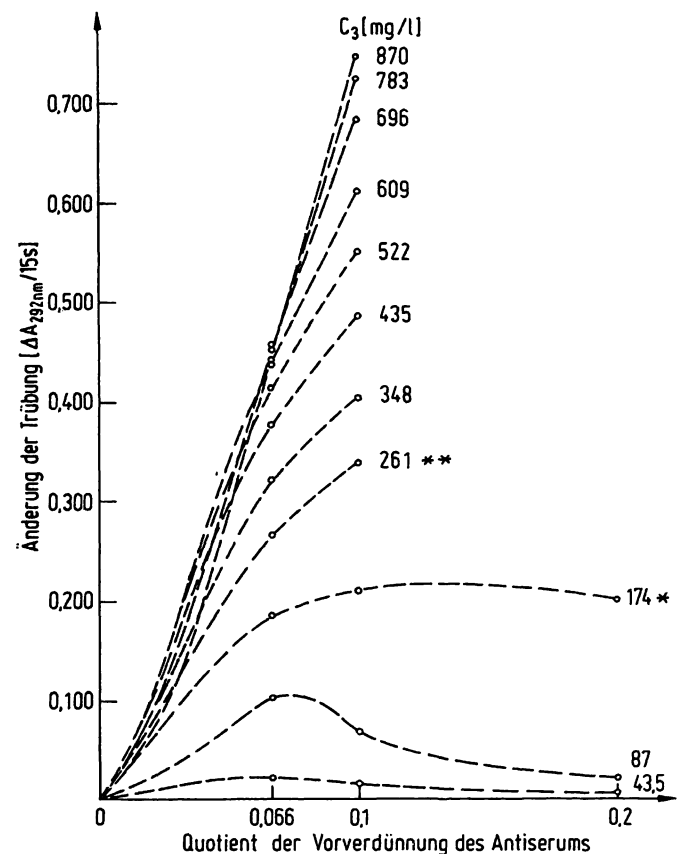


Abb. 3. Trübungsänderung nach 15 Sekunden Reaktionszeit bei unterschiedlichen C₃-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Antiserum-Konzentration:

* → ** Zunehmende Sedimentierung der Präzipitate!

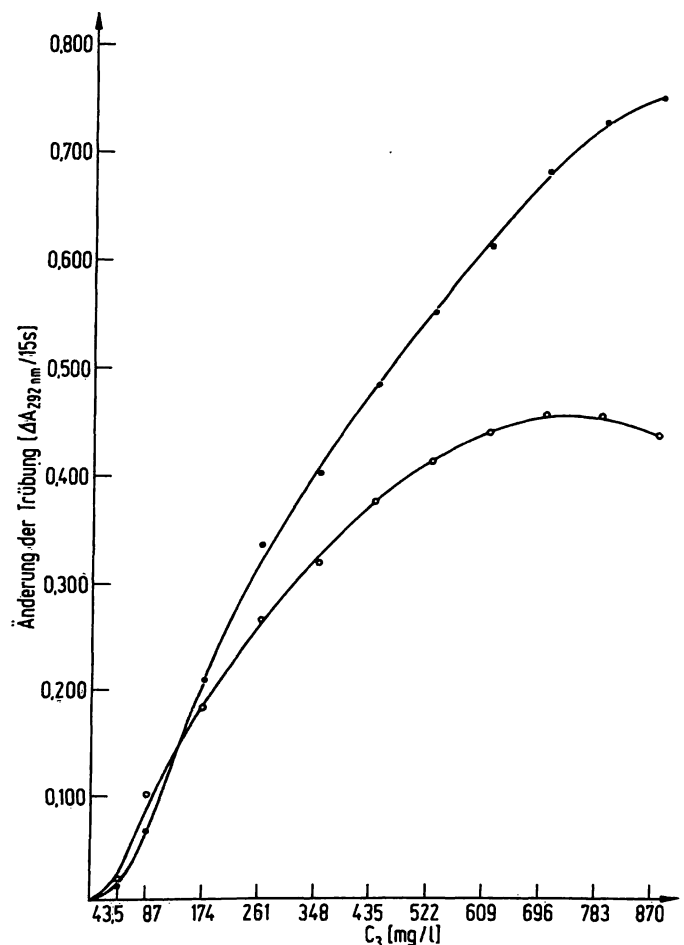


Abb. 4. Kinetisch-immuno-turbidimetrisch ermittelte „Heidelberger-Kurven“:

● — ● Antikörper-Vorverdünnung 1:10,
○ — ○ Antikörper-Vorverdünnung 1:15.

DATE -----
 TIME -----
 TECH -----
 TEST -----
 TO 005
 DT 00:15
 FILTER 292
 ABN ABS 4.9U
 CF 1000
 PRINT 1
 CONC
 RATE
 CUV VALUE
 00 0000
 01 0000
 02 0048
 03 0183
 04 0292
 05 0377
 06 0458
 07 0512
 08 0566
 09 0443
 10 0245
 11 0047
 12 0175
 13 0280
 14 0363
 15 0454
 16 0509
 17 0568
 18 0439
 19 0241

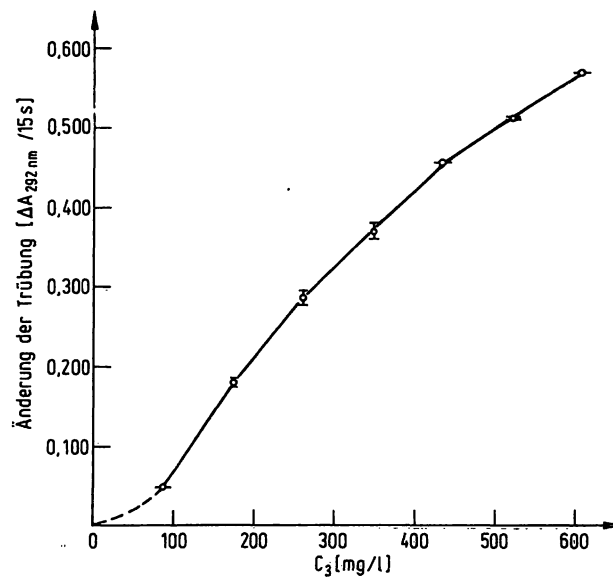


Abb. 5. C3-Standardkurve und Rechner-Ausdruck:
 Werte kinetisch-immuno-turbidimetrisch mit Fast
 Analyzer CENTRICHEM SYSTEM 400 erhalten.

Werteausdruck:

CUV = Rotoreinsatz-Platznummern der Proben,
 VALUE = $\Delta A / \Delta t$.

C3-Standardwerte als Doppelbestimmung aus Standard-
 Human-Serum:

Platz-Nr.	Konzentration [mg/l]	$\Delta A_{292 \text{ nm}} / 15 \text{ s}$ \bar{x}	$\pm s$	VK [%]
01	0,0			
02/11	87,0	0,0475	0,0007	1,49
03/12	174,0	0,1790	0,0057	3,16
04/13	261,0	0,2860	0,0085	2,97
05/14	348,0	0,3700	0,0100	2,68
06/15	435,0	0,4560	0,0028	0,62
07/16	522,0	0,5105	0,0021	0,42
08/17	609,0	0,5670	0,0014	0,00

durch Messen der Anfangs-Kinetik in Abhängigkeit
 von der Antigen-Konzentration typische „Heidelberger-
 Kurven“ ergeben mit „Antikörper-Überschuß“- „Äqui-
 valenzpunkts“- und „Antigen-Überschuß“-Bereichen.

Abbildung 5 gibt ein C3-Standardkurven-Beispiel
 wieder, wie wir es unter den im Methodenteil darge-
 stellten optimierten und standardisierten Bedingungen
 erhalten haben.

In Tabelle 1 und 2 sind relative Richtigkeit, Präzision
 pro Serie und von Tag zu Tag dargestellt und als zu-
 friedenstellend zu bezeichnen.

Aus folgenden Gründen empfiehlt es sich, quantita-
 tive, kinetische immunologisch-turbidimetrische Einzel-
 protein-Analysen mit einem Zentrifugen-Fast-Analyzer
 durchzuführen:

Geringer Arbeitsaufwand, leichte Gerätebedienung,
 minimaler Reagenzien-Verbrauch (z. B. 1 ml Antiserum
 für etwa 40 Analysen) und eine gute Qualitätskontrolle.
 Als besonderer Vorteil gegenüber A.I.P. (= automati-
 sierten Immunpräzipitations-) Methoden (1, 2) ist jedoch
 hervorzuheben, daß bei Messungen, die auf „Initial-Rate“-
 oder „Fixed-Time“-Kinetiken basieren, Bestimmungen
 der probenbedingten Eigentrübungen fortfallen (3–5).
 Eine zusätzliche beträchtliche Rationalisierung ergibt
 sich durch Einsatz eines Zentrifugen-Fast-Analyzers, da
 es mit diesem Gerät möglich ist, bereits schon nach
 20 Sekunden in einem Meßdurchgang parallel 29 Proben-
 Meßwerte zu erhalten.

Tab. 1. Relative Richtigkeit von C3.

Überprüft mit Protein-Standard-Serum B:
 Sollwert = 1230 mg/l.
 (Siehe auch Rechner-Ausdruck bei Abb. 5.)

Platz-Nr.	Verdünnung
09/18	1: 2,8
10/19	1: 2 von 09/18
Ergebnis: \bar{x} -Istwert = 1228,64 mg/l $s = \pm 46,28 \text{ mg/l}$ VK = 3,76%.	
Abweichung: \bar{x} -Istwert vom Sollwert (= 100%): absolut = - 1,36 mg/l relativ = - 0,11%.	

Tab. 2. Qualitätskontrollen aus Standard-Human-Serum:

1. Präzision pro Serie, N = 20:

A 87 mg/l:

$\bar{x} = 0,0894 \Delta A / 15 \text{ s}$, $s = \pm 0,0066$, VK = 7,38%

B 435 mg/l:

$\bar{x} = 0,5370 \Delta A / 15 \text{ s}$, $s = \pm 0,0074$, VK = 1,38%

C 783 mg/l:

$\bar{x} = 0,8061 \Delta A / 15 \text{ s}$, $s = \pm 0,0145$, VK = 1,79%

2. Präzision von Tag zu Tag, N = 10 Tage:

A $\bar{x} = 217,5 \text{ mg/l}$, $s = \pm 9,78$, VK = 4,30%

B $\bar{x} = 435,0 \text{ mg/l}$, $s = \pm 27,96$, VK = 6,39%

Danksagung

Frau Reckinger danke ich für sorgfältige technische Mitarbeit.

Literatur

1. Killingsworth, L. M., Savory, J. & Teague, P. O. (1971), *Clin. Chem.* 17, 374–377.
2. Ebeling, H. (1973), *diese Z.* 11, 209–214.
3. Tiffany, T. O., Parella, J. M., Johnson, W. F. & Burtis, C. A. (1974), *Clin. Chem.* 20, 1055–1061.
4. Buffone, G. J., Cross, R. E., Savory, J. & Soodak, C. (1974), *Anal. Chem.* 46, 2047–2049.
5. Buffone, G. J., Savory, J., Cross, R. E. & Hammond, J. E. (1975), *Clin. Chem.* 21, 1731–1734.
6. Anderson, N. (1970), *Amer. J. Clin. Pathol.* 53, 778–785.

Dr. Herwig Ebeling
Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Hindenburgdamm 30
D-1000 Berlin 45

